

## 公開特許公報

昭53—24033

⑤Int. Cl <sup>2</sup> . A 61 K 39/00 A 61 K 39/36 G 01 N 31/22 G 01 N 33/16	識別記号 ABC ABC 103 	⑬日本分類 30 G 0 30 D 0 30 A 0 30 H 211 30 D 3 113 E 6 113 A 22	序内整理番号 7432—44 6667—44 6617—44 5727—44 6667—44 6904—49 6807—49	⑭公開 昭和53年(1978)3月6日 発明の数 2 審査請求 未請求 (全 15 頁)
---	-------------------------------	--	---	---

## ⑯アレルゲン含有物質およびその製法

⑪特 許 願 昭52—98629

⑫出 許 願 昭52(1977)8月16日

優先権主張 ⑬1976年8月17日 ⑬イギリス国  
⑭34114/1976⑬1977年6月9日 ⑬イギリス国  
⑭34114/1976⑭発明者 ウエン・イエク・リー  
カナダ国マニトバ州ウイニペツ

グ・ロチエスター・プレイス95番

⑭発明者 アレツク・セホン  
カナダ国マニトバ州ウイニペツ  
グ・アカデミーロード694番⑭出 許 人 フアーマシア・アクチエボラ  
グ  
スエーデン国(エスー75104)  
ウプサラ1ビー・オー・ボック  
ス181番

⑭代 理 人 弁理士 山下白

## 明細書

1. 発明の名称 アレルゲン含有物質およびその  
製法ミノ酸ホモ重合体よりなる群から選ばれる、前  
記第1項記載のアレルゲン含有物質。

## 2. 特許請求の範囲

1) アレルゲン分子と非免疫原性水溶性重合体との共有結合結合体でありそしてその結合度がその結合体を免疫対応性かつ実質的に非アレルゲン性および非免疫原性とするようなものであることを特徴とする、問題のアレルゲンに関するレアギン抗体産生の免疫学的に特異的な抑制剤として使用するためのアレルゲン含有物質。

2) 重合体が約2,000～約35,000の分子量を有するポリエレンクリコールである、前記第1項記載のアレルゲン含有物質。

3) 重合体がポリビニルアルコール、ポリビニルビロリドン、ポリアクリルアミドおよびアミノ

4) 問題のアレルゲンに関するレアギン抗体の產生の免疫学的に特異的な抑制剤として使用するアレルゲン含有物質を製造するにあたり、非免疫原性水溶性重合体を得られる結合体を免疫対応性でありかつ実質的に非アレルゲン性および非免疫原性とする程度にアレルゲン分子に共有結合的に結合させることを特徴とする、アレルゲン含有物質の製造方法。

5) 重合体が約2,000～約35,000の分子量を有するポリエレンクリコールである前記第4項記載の方法。

6) 重合体がポリビニルアルコール、ポリビニルビロリドン、ポリアクリルアミドおよびアミノ酸のホモ重合体より成る群から選ばれる前記第4項記載の方法。

- 7) 人を含む哺乳類において薬理学的に許容しうる方法で前記哺乳類に治療的有効薬物で注射することによる問題のアレルゲンに関するレアギン抗体産生の免疫学的に特異的な抑制剤としての前記第1項定義のアレルゲン含有物質の使用。
- 8) 重合体が約2,000～約35,000の分子量を有するポリエチレングリコールである前記第7項記載の使用。
- 9) 重合体がポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミドおよびアミノ酸のホモ重合体より成る群から選ばれる前記第7項記載の使用。

## 3発明の詳細を説明

本発明は、問題のアレルゲンに関するレアギン抗体産生の免疫学的に特異的な抑制剤として使用するための新規なアレルゲン含有物質に関する。本発明はまた、そのような新規なアレルゲン含有物質の製造法にも関する。

本発明はまた、人を含む哺乳類におけるIgEクラスのレアギン抗体により仲介された「即発性タイプ」の一般的アレルギーの免疫学的特異的抑制のための非免疫原性水溶性重合体（例えばポリエチレングリコール）とのアルゲンの免疫寛容性結合体の使用にも関する。

開発国の人団の約15%は、その環境中の一見無害な物質例えは吸入物（例えは喘息および枯草熱の原因となる花粉、ほこりおよび羽毛）、種々の食品、羊毛、薬物その他のアレルギーを患っている。アレルギー患者は、正常な人とは

異つて、これら物質中に存在する抗原（アレルゲン性）成分に対してレアギン抗体を産生する。一般的に、抗原なる語は、免疫反応を引き出しうる物質を意味しており、そして通常これはまた、抗原-抗体相互作用を示すために使用しうる多くのインビトロ（試験管内）およびインビボ（生体内）の免疫学的方法の一つによつて相当する抗体の検出のために使用される物質である。同様に、アレルゲンなる語はレアギン抗体を誘発させそしてこれと結合する能力を有する抗原を意味して使用されている。しかしこの定義は、アレルゲンがIgE以外のクラスの抗体をも誘発せうるという可能性を除外するものではない。本明細書に使用されている場合、抗原性なる語はインビトロで相当する抗体と結合しうる抗原またはアレルゲンの能力として定義されている。アレルゲン性または皮膚活性は、

アレルゲンがインビボで同族レアギン抗体と結合しそれにより全身性アナフィラキシーまたは局所皮膚反応を直接皮膚テストまたは受動的皮内アナフィラキシー（PCA）反応のどちらかで誘発せうる能力として定義される。そして限定された意味における免疫原性なる語は相当する特異的抗体反応をインビボで誘発せらる抗原またはアレルゲンの能力として定義される。免疫寛容性なる語は、特異的様式でインビボで相当する未変性の初めのアレルゲンに対する免疫反応を実質的に抑制するアレルゲン含有物質の能力を意味している。この意味においては、免疫寛容性なる語は免疫抑制と相互発換的に使用されている。

レアギン抗体はこれら抗体を活発に産生する個体かまたはアレルゲン性血清を注入された個体の組織のマスト細胞および好塩基細胞に固定

される免疫グロブリン全群の中で顕著な性質を有している。

適当なアレルゲンによりこれら細胞中に固定された IgE 抗体分子の交叉結合はこれら細胞の顆粒減少を誘発させる。これに次いでこれらの顆粒からの薬理学的血管活性剤例えばヒスタミン、ブラディキニン、アナフィラキシー遅延作用物質(SRS-A)、好エオシン細胞性アナフィラキシー化学走性(chemotactic) フアクター(BCF-A) および血小板活性化フアクターの遊離が起る。これら化合物は血管および平滑筋組織に作用することによってアレルギー症状すなわち全身性または局所的炎症反応を生ずる。重症の場合にはこれら反応はアナフィラキシーを招来する。

現在使用されている治療法は多年にわたる有害アレルゲンの時間のかかる一連の注射を包含しておりそしてこれは天然生成物の固有のアレ

ルゲン性の故にそしてそれによるそれらの全身的アナフィラキシー反応誘発の危険性の故に少數で投与されなくてはならない。

従つて、安全かつ有効な治療法のためには、完全には阻止しないにしても、細胞に免疫学的に特異的な様式で IgE 抗体反応を抑制することによつて免疫寛容性として作用しうべき天然アレルゲンの誘導体を製造することが肝要である。更にこれら免疫寛容性誘導体は二つのその他の性質すなわち(i)それらは非アレルゲン性であるべきでありすなわちそれらはインビボでマスト細胞および好塩基細胞に固定されている IgE 抗体と結合しえないものでありそして従つてアナフィラキシー反応を誘発させえないものであるべきであるということ、および(ii)それらは非免疫原性であることすなわちそれらは反復注射によつてそれら自身に免疫反応を誘発せしめうる

べきではないことを満足せねばならない。

ここに、非免疫原性の水溶性重合体を共有結合的にこれらアレルゲンに結合させて免疫原性アレルゲン〔例えば卵アルブミン(OA) およびブタクサ花粉の水性抽出液の非透析性成分および犬アルブミン〕を実質的に非免疫原性(アジュバントなしで投与した場合)でありかつ非アレルゲン性である免疫寛容性誘導体に変換することによつてこれら目的を達成しうることが発見された。

従つて、本発明は問題のアレルゲンに関するリアーキン抗体の產生の免疫学的に特異的な抑制剤として使用するためのアレルゲン含有物質を包含する。そして前記物質は非免疫原性水溶性重合体とのアレルゲン分子の共有結合結合物であるということ、そしてその結合度がそのようない结合体を実質的に非アレルゲン性および非免

疫原性であると同時に免疫寛容性とするようなものであることを特徴としている。

本発明はまた得られる結合物が実質的に非アレルゲン性かつ非免疫原性であると同時に免疫寛容性となるよう程度に非免疫原性水溶性重合体をアレルゲン分子に共有結合的に結合せしめるそのようなアレルゲン含有物質の製造法をも包含している。

ルゲン  
本発明は更に、前記アレルゲン感受性の動物(人を含む)における問題のアレルゲンに関するリアーキン抗体の形成の抑制にあたつて前記定義のアレルゲン含有物質を治療的有効投与量で薬物学的に許容しうる様式で前記動物に注射することによるアレルゲン含有物質の使用を包含している。

前記アレルゲン含有物質の製造に使用されるべき非免疫原性水溶性重合体としてポリエチレ

ンクリコール特に約2,000～35,000の分子量を有するものが非常に有用であると証明された。この意味におけるポリエチレンクリコールはまた生理学的に許容しうるその誘導体例えはモノ低級アルキルエーテル好ましくはモノメチルエーテルをも包含しているが、この場合分子末端水酸基が共有的にカップリングに關して使用されている。

また、その他の非免疫原性水溶性重合体例えはポリビニルアルコール、ポリビニルビロリドン、ポリアクリルアミドおよびアミノ酸ホモ重合体も使用しうる。

そのような重合体のアレルゲン分子への共有カップリングに対する生物学的活性物質と不活性重合体との間のカップリングに対して一般に使用されているすべてのカップリング方法を使用することができる。そのような方法は例

えば混合無水物、シアヌル酸クロリド、イソチオシアネートによるカップリング、SH誘導体とCH<sub>2</sub>I誘導体との間の反応である。しかしながら所望のカップリングを生ずるその他の方法を考究することは当業者には極めて容易であろう。

カップリング反応はアレルゲン分子および重合体分子中の活性基の間でなされる。必要な場合にはそのような基をカップリング反応の前に前記分子中に導入しなくてはならない。かかる活性基は例えは-NH<sub>2</sub>、-NCS、-SH、-OH、-CH<sub>2</sub>Iおよび-COOHである。そして分子中にすでに存在していない場合には、それらを周知の方法で導入することができる。アレルゲンへの重合体のカップリングは前記のように得られた物質が免疫寛容性（免疫抑制的）でありかつ実質的に非アレルゲン性かつ非免疫原性であるような程度まで実施される。この結果を与えるアルゲ

ン分子に対する重合体分子の結合度はアレルゲンに応じて変化しうる。しかしながら当業者にはそれぞれの場合に異つた程度の一連の結合度の結合体（コンシユゲート）を製造しそして前記要求が満足される特定の範囲を確立することによつて、どのようにして必要な結合物が得られるかということは明らかである。低すぎる結合度はアレルゲン性および免疫原性のある結合物を与えて高すぎる結合度は免疫寛容性でない結合物を与える。

本発明によれば原則的に人および哺乳類におけるアレルギーの一般的形態の原因のすべてのアレルゲンに対して免疫寛容性誘導体を製造することが適當である。そのようなアレルゲンは例えは動物（特に家畜例えは犬、猫、牛、馬その他）、種々の草木の花粉、昆虫毒素、食品、家庭のほこり、だにおよびかびから導かれる。

本発明のアレルゲン含有物質は好ましくは食塩水または生理学的に許容しうるバッファーの溶液の形で使用される。そのような溶液は非経腸的に投与することができ、そして好ましくはそれらは静脈内または筋肉内に投与される。投与は適当な間隔で反復することができる。

アレルゲン含有物質は凍結乾燥状態で保存することができる。

本発明を実施例および表ならびに添付図面を参照して説明するが、ここで第1図および第2図は本発明の手段により得られる試験結果のダイヤグラムを示すものである。試験のための材料および方法は次のとおりである。

#### 動物

同系交配の8～12週令(C<sub>57</sub>BL/6×DBA/2)F<sub>1</sub>マウス(B<sub>6</sub>D<sub>2</sub>F<sub>1</sub>と命名)および交雑交配のラット(hooded rat)がノース・アメリカン・ラボラ

トリーズ・サプライ・コンパニーから購入された。

#### ハブテン-蛋白結合物の製造

卵アルブミン(OA)および牛アーチロブリソンググ (BGG) [それぞれニュートリショナル・ビオケミカル・カンパニー(米国オハイオ州クリーブランド在)およびカルビオケム(米国カリリフォルニア州サンディエゴ在)から購入]を0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液中での2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(DNBS)との反応によるDNP<sub>3</sub>-OAおよびDNP<sub>18</sub>-BGG結合物の合成に使用した。ASC 1mg当たり $6.5 \times 10^{-8}$ MDNPを含有するアスカリス・ズームの2,4-ジニトロフェニル化された抽出物(DNP-ASC)は、全部で5.5mlの蒸留水中で、4.6mgのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の存在下に、4.6mgのASCを2.4mgのDNBSと37℃で2時間反応させることにより製造された。未反応ハブテンはセ

ファデックス(登録商標)0-25(エピクロロヒドリンで交叉結合されたデキストラン、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社製)のカラムを通してのダルエ過により除去された。

#### 免疫および免疫反応測定

至適抗DNPおよび抗OA IgE反応のためにはマウス腹腔内に、0.5mlの磷酸バッファー含有食塩水(PBS)中に新たに調整した水酸化アルミニウム1mgと共に懸濁された1μgの標準低投与量のDNP<sub>3</sub>-OAを注射した。腹腔内経路で投与した場合のこの用量を本明細書では以後感作用量と呼称する。

ブタクサ(RAG)花粉アレルゲンに特定的な至適IgE反応は、マウスにおいては、1μgのAl(OH)<sub>3</sub>の存在下に10μgのRAGまたはRAGの粘膜成分の一つを表わすAgEを腹腔内に注射することにより誘発される。AgEはワージントン・

バイオケミカル・コーポレーション(米国ニュージャージー州フリーホールド在)から購入された。マウスはまた抗DNPおよび抗AscIgE抗体誘発のために0.5mlのPBS中で1μgのAl(OH)<sub>3</sub>と予備混合したDNP-Asc 10μgによつてもまた感作させた。5匹のマウス群を同一の方法で処置しそして各群内のマウス血清を受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)アッセイにより平均レアギン力値を測定するためにプールした。滴定の終点は直径5mmの反応を与える各血清の最高希釈の逆数とした。異つたラットにおいて測定された同一レアギン血清のPCA力値は、2のフタクター内で再現性であつた。すべてのPCA力値は2回の測定の平均として報告されている。免疫マウスの血清中のレアギン以外の免疫グロブリンクラスの抗体の共存は、受動的血球凝集(HA)アッセイにより確立された。

分析の感度はこの研究に対しては充分であると考えられた。その理由はそれが対照として標準免疫DNP血清を使用して各HA試験に対して1,000の程度のHA力値を与えたからである。

チエスター・ビーティ系ラットにおいて至適抗DNPおよび抗OA反応を誘発させるためには、これら動物に1μgの新しく調製したAl(OH)<sub>3</sub>および $10^{10}$ 個のポルテテラベルトウシスクチン(コンノートラボラトリーズ社製品)を懸濁させた0.5mlのPBS中の1μgのDNP<sub>3</sub>-OAを腹腔内注射した。マウスおよびラットで產生されたIgE抗体の力値を雜交配ラットにおける受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)アッセイにより測定した。

#### アドバティブ細胞移植

この方法は感作しそして免疫寛容化したマウスから脾細胞をX線照射(550R)同種遺伝子

保持受容体に移植そして受容体に細胞移植4時間後IC Al(OH)<sub>3</sub>の存在下に標準感作量の抗原を注射することよりなる。

#### 例 1～2

6,000および20,000の平均分子量を有するポリエチレングリコール（本明細書中では以後においてPEG<sub>6</sub>およびPEG<sub>20</sub>と呼ぶ）（ベーカーケミカル・コンパニー製品）の2バッチを、シアヌル酸をカッティング剤として使用してシャロン氏等の方法 [J. Immunol. 114, 1585 (1975) 参照] と同様にしてOAおよびRAGにカッティングさせた。

OA-PEG<sub>6</sub>およびOA-PEG<sub>20</sub>結合物は次のようにして製造された。

6 mlの0.5N NaOHに溶解させたどちらかのPEG（0.4g）を5 mlのPBS中の0.1gのOAと混合し、そしてシアヌル酸クロリドの溶液（3 ml

のN,N'-ジメチルホルムアミド中0.2g）を一定の攪拌を行ないつつこの混合物に滴下添加した。室温で2時間そして4℃で更に24時間の間攪拌しつつ反応を進行せしめた。この反応混合物を次いで、PBSに対して透析してすべての未反応シアヌル酸クロリドを除去し、そして減圧下に5～7 ml体積まで濃縮させた。この結合体を次いでフルマシア・ファイン・ケミカルズ社のセフアロース（登録商標）4Bカラムを通して溶出剤としての硼酸バッファー含有食塩水（BBS）を使用して沪過することによつて遊離PEGおよびOAから単離した。OA-PEG結合物は主としてカラムの空孔容積に相当する分画中に存在していた。これら分画を集めそして濃縮した。

RAG-PEG<sub>6</sub>およびRAG-PEG<sub>20</sub>の製造法はOA-PEG結合体に対して記載したものと同様であつた。すなわち、その反応混合物は2 mlの0.5N NaOH

中0.1gのPEG<sub>6</sub>またはPEG<sub>20</sub>、50 ml PBS中4.0 mgのRAGおよび1 mlのN,N'-ジメチルホルムアミド中8.0 mgのシアヌル酸クロリドよりなつていた。RAG-PEG結合体もまた前記のようしてセフアロース4Bカラムを通しての沪過によつて単離された。

次に生物学的実験について述べる。

#### I. DNP-OA系

(A) OA-PEG結合体とのレアギン抗体反応の抑制  
レアギン抗体産生に及ぼすOA-PEG<sub>6</sub>結合体の効果を試験するために、1 mgのOA-PEG<sub>6</sub>をマウスに静脈内注射し、その4時間後にそれらを第0日IC Al(OH)<sub>3</sub>中の1 mgのDNP<sub>5</sub>-OAの標準感作量で免疫した。マウスには、それ以上の結合体の投与を与えることなしに、第28日に免疫抗原の腹腔内第2回注射を与えた。対照マウス群には結合体の代りにPBSが与えられた。ハブ

テンおよびキャリアに対して特異的なレアギン抗体反応は第1図に説明されている。第1図中で縦軸上のPCA力値は横軸上の週で表わした時間に対してプロットされている。上方の二本の曲線は対照群に関するものでありそして下方の二本の曲線は試験群を表わすものである。実線で描かれた曲線は抗DNPを示し、また~~虚~~<sup>一点</sup>線の曲線は抗OAを表わす。

第1図からみられるように、対照群はハブテンおよびキャリア両方に対する最高の一次IgE反応（レスポンス）が感作後14日目に示され、そして被者に強化された二次抗DNPおよび抗OA IgE反応は一次免疫後4週間目に投与された感作量のDNP-OAの第2次注射後7日目に誇発される。他方、第0日IC OA-PEG<sub>6</sub>の単一注射で処理されたマウスはDNPおよびOA両者に対する一次IgE反応の完全抑制を生じた。そしてこれら

マウスの二次免疫は対照動物に對して記録されたものの約10%に相当する低いIgE反応のみを誘発させた。従つて、OA-PEG<sub>6</sub>によるマウス処理がDNP-OA反応に包含されたOA特異性Tヘルパー細胞の長期間抑制を生ずることが明白である。

観察されたOA-PEG<sub>6</sub>の抑制効果が免疫学的に特異的であるかどうかを検査するために、感作薬量のDNP-OAを与える4時間前に1mgPEG<sub>6</sub>をマウスに静脈内注射した。他のマウス群には、PEG<sub>20</sub>をPEG<sub>6</sub>の代りに置きかえた。通常のようIC対照マウスには感作薬量のDNP-OAのみを与えた。すべてのマウスに第20日に第二次感作薬量のDNP-OAが与えられた。表Ⅰに記載の結果から、遊離PEG<sub>6</sub>またはPEG<sub>20</sub>はどちらも動物のレアギン抗体反応生成能力に影響しないことが明らかであり、そして従つてOA-PEG<sub>6</sub>ICより誘発され

た抑制は、PEG<sub>6</sub>ICカツブリングされた抗原に実際に特異的であると結論することができる。

#### (B) OA-PEG<sub>6</sub>による免疫抑制の特異性

IgE抗体の観察された抑制反応の特異性を更に例証するためにマウスに第0日目にAL(OH)<sub>3</sub>中の1μgのDNP-OAまたは10μgのDNP-AsCを腹腔内投与する4時間前に、0.8mgのOA-PEG<sub>6</sub>の静脈内注射をした。第28日にこれら動物にAL(OH)<sub>3</sub>中の同一抗原の第二次腹腔内注射をなした。OA-PEG<sub>6</sub>を与えられなかつた二つの対照マウス群をこの実験に加えた。すなわち一つの群には第0日および28日にDNP-OAの二つの感作薬量を与えそして他の一群には同一日にAL(OH)<sub>3</sub>中の10μgのDNP-AsCの二薬量が与えられた。

表ⅡIC要約されている知見は、OA-PEG<sub>6</sub>の静脈内投与によるDNPおよびOA両方に對するIgE

反応の抑制の特異性に對して更に支持を与えるものである。すなわち、OA-PEG<sub>6</sub>で処理したマウス(試験A)はDNP-OAで感作された場合、DNPまたはOAのどちらに對しても一次IgE反応を示さず、そしてそのDNP-OAICに対する二次反応は対照動物のものより顕著に低かつた。他方、OA-PEG<sub>6</sub>結合体によるマウス処理は、無関係の抗原DNP-AsCICに対してIgE抗体反応を示すそれらの能力には影響しなかつた。すなわち、対照Bおよび試験B各群のマウスの動物血清のIgE抗DNPおよび抗AsC抗体力値IC有意の差はなかつた。

#### (C) OA-PEG結合体のレアギン抗体反応進行阻止能力

本実験は、抑制前少くとも5週間前IC確立せしめた進行性レアギン抗体反応をOA-PEG結合体の投与により阻止する可能性を調べるためにも

のである。注射のスケジュールおよび血清のPCA力値は表Ⅲに示されている。これらのデータは、DNPおよびOAICに対する長時間持続性でしかも増強されたIgE反応は第40日および第68日に第二次および第三次感作薬量を与えた対照マウス群においては、82日以上にわたつて保持されうるけれども、第37日、第38日および第39日に感作マウスに3回1日当たり0.8mgのOA-PEG<sub>6</sub>を静脈内注射投与することは第二次および第三次注射後のこれら動物の抗DNPおよび抗OA IgE反応を発塊する能力を非常に顕著に低下させる結果となつたことを示している。

OA-PEG<sub>20</sub>がDNP-OAに対するレアギン抗体反応継続を阻止しうるであろうことを証明するためIC、第0日IC DNP-OAで感作したマウスに第22日IC 1mgのOA-PEG<sub>20</sub>の注射を与え、そして第

実この解説は以下に報告する実験において正しいことが証明された。

(D) アドブティプ移植における非反応性の保持

脾細胞のすべてのドナーを、屠殺45日前に感作薬量のDNP-OAで免疫した。それらの脾臓除去の9日前に、これら動物を3群にわけ、そして各群には0.5 ml PBS中0.2 mgのOA-PEG<sub>6</sub>の静脈内薬量、0.5 ml PBS中0.8 mgのOA-PEG<sub>6</sub>、または0.5 ml PBSのみを与えた。すべての動物を次いで殺しそして3群の各々の $5 \times 10^7$ 個の脾細胞懸濁液を受容体たる同一遺伝子を有するX線照射(550R)マウスIC移植した。細胞移植4時間以内に、すべての受容体IC DNP-OAの感作薬量を腹腔内投与した。そしてこれらの抗DNPおよび抗OA IgE抗体力値を2週間にわたって追跡した。

表Vから明らかのようにレアギン抗体水準は

細胞移植のために殺すことになつてゐる。無処理感作マウスIC OA-PEG<sub>6</sub>を注射した後5日以内にはわずかに抑制されているだけであつた。しかしながら、アドブティプ移植後、OA-PEG<sub>6</sub>で処理した試験マウスの脾細胞はX線照射された受容体に投与された追加のDNP-OAの感作薬量ICに対して対照群のマウス脾細胞に比べて非常に劣つた程度にしか反応しなかつた。従つて、感作マウスのOA-PEG<sub>6</sub>処理はアドブティプ移植後抗原の追加感作薬量IC再露出させた場合のこれら動物の脾細胞のレアギン反応発現能力を阻止する結果となるということを結論することができる。

(E) OA-PEG結合体による血球凝集抗体の抑制

レアギン抗体産生に及ぼすOA-PEG結合体の抑制効果の他に、これらの結合体の血球凝集抗体産生に及ぼす効果が研究された。この目的のた

めに、マウスに感作薬量のDNP-OA投与の4時間前IC、0.2 mgまたは1.0 mgのOA-PEG<sub>6</sub>またはOA-PEG<sub>20</sub>の静脈内注射を与えた。そしてすべてのマウスIC 28日後に第二の感作薬量の注射を与えた。表VIに記載した結果により示されるように、2種のOA-PEG生成物のどちらも0.2 mg薬量では血球凝集力値には有意の効果を有していなかつた。しかしながら、0.8 mgのより高い薬量におけるOA-PEG調製物の投与は低いがしかし有意の血球凝集抗体抑制を招來した。そしてこの効果は抗OA血球凝集抗体よりも抗DNP ICに対してより顕著であつた。これらの知見からOA-PEG結合体はIgMおよび/またはIgG抗体産生におけるよりもIgE抗体の産生に関与する細胞に対して一層顕著な抑制効果を有していると推定できる。

II. ブタクサアレルゲン系

## (F) RAGに対するレアギン抗体反応の阻止

RAG ICに対するレアギン抗体の至適產生は、  
B<sub>6</sub>D<sub>2</sub>F<sub>1</sub>マウスにおいては、0.5 ml PBS IC 1 mg  
Al(OH)<sub>3</sub>と共に 1.0 μg の RAG を懸濁させたものを投与することによつて誘発されることが示された。従つて、以後に記載される実験においては、ブタクサアレルゲンに対するレアギン抗体誘発のための標準感作薬量は 0.5 ml の PBS 中の Al(OH)<sub>3</sub> 1 mg と混合した 1.0 μg の RAG よりなつていた。RAG のレアギン反応を阻止する試みにおいては、感作されたマウスに第 15 日に 0.8 mg の RAG-PEG<sub>6</sub> または RAG-PEG<sub>20</sub> を与えた。その試験結果は第 2 図に表わされているが、その縦軸の抗 RAG PCA 力価は横軸上に過で表わした時間に対してプロットされている。実線の曲線は対照群を表わし、そして破線の曲線は RAG-PEG<sub>20</sub> 群をして破一点錐線の曲線は

RAG-PEG<sub>6</sub> 群を表わしている。第 2 図からわかるように、これら 2 種の RAG-PEG 結合体のどちらかによる処理は抗 RAG IgE 抗体の低下を生じそしてこの IgE 抗体の水準は第 21 日 IC RAG の第二感作薬量の投与にもかかわらず減少しつづける。対照的 IC、対照動物は典型的二次反応を発現する。

抗 RAG レアギン反応に及ぼす RAG-PEG 結合体の抑制効果の特異性は、表Ⅷに概記した実験において示された。すなわち、第 33 日に静脈内経路で OA-PEG<sub>6</sub> または RAG または PBS を与えたマウスに一次免疫後第 34 日 IC 第 2 の RAG 感作薬量を投与することは IgE 反応を強化する結果とはならなかつた（すなわち、抗 RAG PCA 力価は 5 日の程度であつた）が、しかし前日に RAG-PEG<sub>6</sub> を与えられた動物 IC 第 34 日 IC 第二感作薬量を投与することは顕著な抗 RAG レアギン

力価の低下を生じた（すなわち抗 RAG PCA 力価は 60 に減少）。更に、第 33 日 IC Al(OH)<sub>3</sub> なしに未結合の RAG 調製物 5.0 mg を投与することは第 41 日に検出した二次反応を妨害しなかつたという事実（これは第 34 日の RAG 第二感作薬量により動物を再注射したこととの結果である）は、前記に観察された抗 RAG IgE 抗体水準の低下が注射された結合物による IgE 抗体の中和によるものではなくて、特定的な抗 RAG IgE 反応抑制にいたる動物の免疫系の緩和（モジュレーション）によるものであることを示している。また、第 28 日（すなわち、免疫動物に対して抗体の第二感作薬量を投与した日と同日）における 8.0 mg の RAG の静脈内投与は、第 35 日の第二の抗 RAG PCA 力価を約 20 まで低下させる結果となつたこともまた注目すべきである。これは循環 IgE 抗体の中和に由来するものでありうる。しかしながら、これらの動物でさえも免疫学的な抑制の徵候は全くみせなかつた。その

第 56 日に第三感作薬量の RAG で更に免疫すると、通常の既往性 IgE 反応を生ずるからである。

## (G) OA-PEG および RAG-PEG 結合体の PCA 反応発現不能

OA-PEG 結合体のアレルゲン性を、PCA アツセー法を使用してラットで試験した。この目的のために、DNP-OA の单一感作薬量で腹腔内免疫することにより生成された既知の PCA 力価（すなわち 1400）の標準マウスレアギン血清 0.1 ml を迅速 IC 2 倍希釈し、そしてこれら希釈溶液の 5.0 ml 容量を雄交配ラットの剃毛した皮膚に皮下注射した。皮膚感作の 24 時間後 IC、異つた前の未変性 OA または OA-PEG<sub>6</sub> または OA-PEG<sub>20</sub> および 0.5 % エバンスブルー染料含有溶液 1.0 ml を異つたラットに静脈内注射した。30 分後にラットを殺して PCA 反応を判定した。

表Ⅸからわかるよう IC、1 mg の未変性 OA は、

強い PCA 反応を呈し、そして OAへの分子量6000または20,000のどちらかの未結合PEGの添加はOAに由来するPCA反応を阻害しなかつた。それに対照的に OA-PEG<sub>6</sub> および OA-PEG<sub>20</sub>は共に OA よりもはるかに一層多量で注射された場合（すなわちそれぞれ 10 mg および 6 mg）でさえも有意の反応を引き出し得なかつた。更に、実験 8 および 9 は、OA-PEG<sub>6</sub> または OA-PEG<sub>20</sub>のどちらかで試験された場合に PCA 反応を全く示さなかつた動物がこれら結合物の一次チャレンジから 20 分後 1 mg の未変性 OA を再注射した場合には良好な反応を与えたことを示している。これらの結果は、OA-PEG 結合物がインビボでは抗 OA-IgE 抗体を結合<sup>14</sup>および中和しえなかつたことを示す。この解釈に照らして、実験 5 で観察された 10 mg 濟量の OA-PEG<sub>6</sub> による最小 PCA 反応（6 日の程度の力値）はチャレンジに使用さ

れた OA-PEG<sub>6</sub> 調製物中の非常に少量の未変性 OA の存在または OA 1 分子当たりに非常に少量の PEG 分子を含有しそして従つてまだ若干の接近可能な抗原決定因子を有しているようである種の OA-PEG 結合体の存在に由来すると考えることができ。これらすべての結果に基づいて、OA の PEG 結合物は PCA 反応を誘発させえないかまたは感作皮膚部位に結合している抗 OA-レアギン抗体を中和しえないと云ふことは、最初の OA の抗原決定因子が接近不可能であるかまたは OA-PEG 結合物中で根本的に変化されているという事実に由来すると結論することができる。

RAG-PEG<sub>20</sub> の PCA 反応誘発能力は、ラット皮膚感作に対してネズミ科の抗 RAG-レアギン血清を使用して前記のようにして試験された。感作皮膚部位のチャレンジに対しては、RAG または RAG-PEG<sub>20</sub> のどちらかの溶液（エバンスブル

ー染料の存在下に）をラットに静脈内注射した。これら PCA 試験の結果は、表Ⅱに要約されている。このことから、未変性 RAG アレルゲンは強い PCA 反応を引き出すが、RAG-PEG<sub>20</sub> はいかなる PCA 反応をも引き出さないと結論することができる。更に、この表に示した最後の実験の結果は、RAG-PEG<sub>20</sub> の投与がその 20 分後に未変性 RAG を動物に再注射した場合の PCA 反応引き出しを阻害しなかつたということを示している。従つて、RAG-PEG<sub>20</sub> 結合物は未変性 RAG アレルゲンが所有している容易に近接可能な抗原決定因子を有していないといふこと、そして従つて抗 RAG IgE 抗体でコーティングされたマスト細胞を誘発させえないといふことが推定される。

#### (4) OA 感作ラットにおける OA-PEG 結合体のアナフライキシー誘発不能

以下に記載の実験は、OA-PEG 結合体がインビ

ボでは抗 OA IgE 抗体と結合しえないと云ふ別の証明を与えるものである。マウスはヒスタミンに対して抵抗性なので相当する抗原に対する IgE 抗体を有しているマウスへの感作抗原注射は容易にはアナフライキシーを誘発しない。従つて、OA-PEG 結合体がインビボでマスト細胞結合抗 OA IgE 抗体と結合しそしてアナフライキシー反応を誘発させうるかどうかの試験に対してアナフライキシーを生じやすいラットが選ばれた。この目的のためには、チエスター ピーテイ系ラットを前記 ONP-OA で免疫することによって全身的に感作させた。全身反応に対しては、1 ml の PBS 中 2 mg の未変性 OA または OA-PEG<sub>6</sub> または OA-PEG<sub>20</sub> を出血の 6 時間後に各感作動物に静脈内投与しそしてこれら化合物のすべての効果を注意して観察した。OA の静脈内注射を受けたすべての感作ラットは 15~30 分以内にアナフ

イラキシーショックで死亡した。対照的に、  
OA-PEG<sub>6</sub> または OA-PEG<sub>20</sub> のどちらも、感作動物  
への投与によつて何ら観察可能な不快症状を誘  
発させなかつた。前記 (9) IC 報告されたと一致  
するこれらの知見は更に、PEG 変性抗原がイン  
ビボで能動的に感作した動物の IgE 抗体と相互  
反応しないということ、そして従つてアナフィ  
ラキシ-反応を誘発させえないということを明  
瞭に示すものである。

表 I 遊離PEG のレアギン抗体反応抑制不能

群	処 置		一次免疫		二次免疫		PCA 力 価	
	0 日	28 日	日 抗DNP	抗OA	日 抗DNP	抗OA		
			抗DNP	抗OA	抗DNP	抗OA		
対照*	DNP-OA	DNP-OA	14	3470	2090	35	930	1620
					42	1620	2470	
試験 A**	PEG <sub>6</sub> ブラ DNP-OA	14	3470	1600	35	1400	1400	
	スDNP-OA			42	1700	2690		
試験 B***	PEG <sub>20</sub> ブラ DNP-OA	14	2620	1410	35	980	1660	
	スDNP-OA			42	1280	1620		

特開昭53-24033 11)

\* 対照群のマウスには第 0 日および第 28 日  
に感作薬量の DNP-OA を与えた。

\*\* 第 0 日に試験群 A および B のマウスは感作  
薬量の DNP-OA の投与の 4 時間前に 1 mg の PEG<sub>6</sub>  
または PEG<sub>20</sub> を与えられ、そして第 28 日に  
は感作薬量の DNP-OA の注射だけが与えられた。

表 II OA-PEG 結合体の免疫抑制の特異性

群	処 理		一次免疫			二次免疫			PCA 力 価	
	0 日	28 日	日 抗DNP	抗OA	抗 Asc	日 抗DNP	抗OA	抗 Asc		
			抗DNP	抗OA	抗 Asc	抗DNP	抗OA	抗 Asc		
対照 A*	DNP-OA	DNP-OA	14	1,000	1,000	N.T.	35	3,310	3,500	N.T.
						42	1,280	3,020	N.T.	
試験 A**	OA-PEG <sub>6</sub> ブラ スDNP-OA	DNP-OA	14	<10	<10	N.T.	35	80	480	N.T.
						42	480	860	N.T.	
対照 B*	DNP-Asc	DNP-Asc	14	890	N.T.	200	35	1,000	N.T.	1,500
						42	640	N.T.	840	
試験 B***	OA-PEG <sub>6</sub> ブラ スDNP-Asc	DNP-Asc	14	600	N.T.	180	35	1,650	N.T.	1,700
						42	780	N.T.	640	

\* 対照群 A および B のマウスは第 0 日および第 28 日にそれぞれ、感  
作薬量の DNP-OA または Al(OH)<sub>3</sub> 中 10 μg の DNP-Asc が与えられた。

\*\* 試験群 A のマウスは第 0 日に DNP-OA の感作薬量の投与の 4 時間前に  
800 μg の OA-PEG<sub>6</sub> の静脈内注射が与えられ、そして第 28 日に同一  
薬量の DNP-OA がチャレンジされた。

\*\*\* 試験群 B のマウスは第 0 日に Al(OH)<sub>3</sub> 中 10 μg の DNP-Asc で感作さ  
れる 4 時間前に 800 μg の OA-PEG<sub>6</sub> の静脈内注射が与えられ、そして  
第 28 日に同一薬量の DNP-Asc がチャレンジされた。

N.T. = 試験せず

表III OA-PEG<sub>6</sub>による継続レアギン抗体反応の阻止

群	処理	PCA 力値					
		一次免疫		二次免疫			
日	化合物	日	抗DNP	抗OA	日	抗DNP	抗OA
对照	0 DNP-OA	36	450	680			
40	DNP-OA		47	5,750	7,500		
			54	3,310	6,460		
68	DNP-OA		75	5,750	12,750		
			82	3,570	6,800		
試験	0 DNP-OA	36	450	680			
37	OA-PEG		47	230	1,600		
38	OA-PEG		54	1,400	2,050		
39	OA-PEG						
40	DNP-OA		75	800	2,560		
			82	760	1,800		

表 IV

OA-PEG<sub>20</sub>による継続レアギン抗体反応の阻止

群	処理	PCA 力値			
		一次免疫		二次免疫	
日	化合物	日	抗DNP	日	抗OA
对照	0 DNP-OA	14	1,660	1,280	35
	DNP-OA NIL	21	850	1,660	42
		24	870	1,620	5,120
試験	0 DNP-OA OA-PEG <sub>20</sub> (0.8mg)	14	1,660	1,280	35
		21	850	1,660	42
		24	835	1,660	800

表 V

アドバティブ細胞移植における非反応性の保持

群	ドナーマウス の処理*	PCA 力値** (細胞移植前)			POA 力値 (細胞移植後)			
		0日	36日	日	抗DNP	抗OA	日	抗DNP
対照	DNP-OA PBS	14	1,280	1,800	7	900	1,500	
		36	850	1,850	14	1,280	1,950	
		38	810	1,960				
		41	810	2,950				
試験	DNP-OA OA-PEG <sub>6</sub> (0.2mg)	14	1,280	1,800	7	40	320	
A		36	850	1,850	14	80	370	
		38	710	1,700				
		41	760	1,600				
試験	DNP-OA OA-PEG <sub>6</sub> (0.8mg)	14	1,280	1,800	7	40	180	
B		36	850	1,850	14	60	270	
		38	350	1,280				
		41	400	1,280				

\* すべてのX線照射受容体には適当なドナーマウスからの $5 \times 10^7$ 個の脾細胞の移植後4時間以内に感作用量のDNP-OAが与えられた。

\*\* 表のこの部分でのPCA力値はマウス感作後第14日、第36日、第38日および第41

日のドナーマウス中のレアギン抗体水準を意味している。

\*\*\* 表のこの部分のPCA力値はアドバティブ移植後第7日および第14日に検出された受容体マウスのレアギン抗体水準を意味している。

表VI 血球凝集抗体反応に対するOA-PEG結合体の影響

群	処理*	LOG <sub>2</sub> HA 力値**			
		一次免疫		二次免疫	
日	抗DNP	抗OA	日	抗DNP	抗OA
対照	DNP-OA	7	4	2	35
		14	6	5	42
試験A	OA-PEG <sub>6</sub> (0.2mg) プラスDNP-OA	7	4	2	35
		14	4	6	42
試験B	OA-PEG <sub>6</sub> (1.0mg) プラスDNP-OA	7	3	2	35
		14	3	4	42
試験C	OA-PEG <sub>20</sub> (0.2mg) プラスDNP-OA	7	5	1	35
		14	6	5	42
試験D	OA-PEG <sub>20</sub> (1.0mg) プラスDNP-OA	7	4	2	35
		14	3	2	42

\* 第0日に記載の処理を与えた他に、すべてのマウスは第28日に第2のDNP-OA感作注射が与えられた。

\*\* HA 力価はマウスの第一感作後第 7、14、35

および 42 日目に測定された。

表Ⅶ RAG-PEG<sub>6</sub>による免疫抑制の特異性

群	処理*			第41日の抗 RAG PCA 力価
	0日	33日	34日	
対照 I	RAG	PBS	RAG	480
対照 II	RAG	RAG (500 μg)	RAG	560
対照 III	RAG	OA-PEG <sub>6</sub> (500 μg)	RAG	500
試験	RAG	RAG-PEG <sub>6</sub> (500 μg)	RAG	60

\* すべての 4 群の動物は第 0 日および第 34  
AL(OH)<sub>3</sub> 中の  
日 IC RAG の二つの感作量が与えられそして

第 33 日には各群には第 3 棚に記載の化合物  
(AL(OH)<sub>3</sub> なし)  
が静脈内 IC 与えられた。そして第 41 日目に

抗 RAG レアギン抗体が供試された。

表 VII

## OA-PEG 結合体の PCA 反応発現不能性\*

実験番号	チャレンジに使用する化合物	注射量(μg)	PCA 力価
1	OA	1	1,400
2	OA + PEG <sub>6</sub> **	1 3	1,500
3	OA + PEG <sub>6</sub> **	1 3	1,500
4	OA-PEG <sub>6</sub>	1	<10
5	OA-PEG <sub>6</sub>	10	60
6	OA-PEG <sub>20</sub>	1	<10
7	OA-PEG <sub>20</sub>	6	<10
8	OA-PEG <sub>6</sub> +20分後 OA	1 1	<10 960
9	OA-PEG <sub>20</sub> +20分後 OA	1 1	<10 900

\* 雜交配ラットをマウス抗 OA レアギン血清で皮内感作させ、そして 24 時間後に PBS 中のエバンスブルー染料と共に第 2 棚に示した化

合物の静脈内注射でチャレンジした。

\*\* PEG<sub>6</sub>と PEG<sub>20</sub>との未結合調製物をエバンスブルー染料の存在下に OA と共に同一溶液中で注射した。

表Ⅷ RAG-PEG 結合体の PCA 反応発現不能\*

実験番号	チャレンジに使用された化合物	化合物 量(μg)	PCA 力価
1	RAG	1	740
2	RAG-PEG <sub>20</sub>	1	<10
3	RAG-PEG <sub>20</sub> +20分後の RAG	1 1	<10 740

\* 雜交配ラットをマウス抗 RAG レアギン血清で感作させ、そしてこれらを 24 時間後にエバンスブルー染料の存在下に第 2 棚に示した化合物を静脈内注射することによってチャレンジした。

## 例 3

混合無水物を使用して犬アルブミン(DA)と異

つた分子量のモノメトキシポリエチレングリコール(m PEG-OH)との結合体を製造した。この方法は 3 段階を包含している。

a) mPEG-O— $\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}_2\text{COOH}$  の製造

20 ml 乾燥ビリジン中の mPEG-OH (0.8 ミリモル) の溶液に、800 mg (8 ミリモル) のコハク酸無水物を加えそして合した溶液を室温で一夜攪拌した。浴媒を真空中に蒸発により除去した。残渣を 15 ml のベンゼンに溶解させ、そしてその生成物を 20 ml の予冷したヘキサンの添加により沈殿させた。次いで沈殿を沪過により集め、そしてこれを蒸留水中に溶解した。水性溶液をカンティボア(登録商標) カンマ透析バッケ( m.w. カットオフ 4,000, タオントイメトリックス社製) 中で蒸留水に対して透析しそしてその生成物を最後に凍結乾燥した。

b) mPEG-O— $\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{COOCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  の製造

$m\text{PEG}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (0.4ミリモル)を10mlのクロロホルムに溶解させた。その温度を氷浴を使用して0°Cを保ち、そしてこの溶液に乾燥窒素ガスの泡を通した。トリエチルアミン(0.4ミリモル)をこの溶液に加え、そしてその後でイソブチルクロロホルムート(0.4ミリモル)を滴加した。反応溶液を30分間0°Cに保ちそして次いで室温で真空下に蒸発させた。残渣を数回石油エーテルで洗いそして白色結晶性生成物を得た。

c) 犬アルブミンと  $m\text{PEG}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ との結合

犬アルブミン(200mg)を30mlの硼酸バッファー(pH 9.6)に溶解させた。温度を氷浴を使用して0°Cに保つた。 $m\text{PEG}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (量に関しては表X参照)を固体状態で少量ずつ加えた。この反応溶液を0°Cで3時間攪拌し、

そして次いで16時間冷蔵庫に保存した。次いでこの反応溶液をセフアロース(登録商標)6Bカラムに通した。蛋白を含有しそして  $m\text{PEG}$  脱導体を含まない分画を集め、そして凍結乾燥した。遊離  $m\text{PEG}$  は薄層クロマトグラフィーで検出された。

表 X

物質 番号	$m\text{PEG}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	犬アルブミン(DA) 分子量	結合体		結合度 PEG/DA
			分子量	使用量(mg) 遊離アミノ基	
3a	2,000	200	200	50	13
3b	2,000	280	200	42	21
3c	2,000	1,000	200	23	36
3d	3,500	500	200	54	9
3e	3,500	870	200	45	15
3f	3,500	1,750	200	29	33
3g	3,500	2,500	200	23	35

結合度は、nmr技術によつて変換された犬アル

ブミン中の  $m\text{PEG}$  置換基の量を定量することによって決定された。遊離アミノ基の数は、オーフタルアルデヒド法(Biochim.Biophys.Acta 第434巻(1976)第209頁参照)を使用して測定された。表Xには結合度はDA 1分子当たりのPEG分子数として与えられている。

そのようにして製造された結合体のアレルゲン性、免疫寛容性および抗原性を試験しそしてその結果は次の表Ⅱに要約されている。

免疫寛容性は、前記の方法に従つて判定されそして免疫寛容の程度はDAの3感作薬量のみを与えられた対照動物の力価に關しての第3感作後のIgE力価の平均低下を表わしている。6~100のファクターだけの減少は、良好な免疫寛容度を意味している。

アレルゲン性は、二つの方法すなわちRASTベースの方法およびPCA中和試験により測定され

た。

RASTベースの方法[Int.WHO IABS Symp. on Standardization and Control of Allergens Administered to Man 1974, Develop.Biol. Standard. 第29巻第151~165頁(1975年)参照]においては、変性アレルゲンをアレルゲン特異性 IgE 含有血清と反応させる。過剰の IgE は未変性アレルゲンと反応し、共有結合的に紙ディスクにカップリングする。IgEに対する放射性ラベル抗体を加えてコンプレックスを生成させる。このコンプレックスの放射能をカウンタで測定する。カウント数は抽出物との反応後の血清中の IgE の過剰量と直接比例している(前記参照文献参照)。変性アレルゲンのアレルゲン活性は、天然犬アルブミンのもの(100%)のパーセント数として表わされる。

変性アレルゲンの抗原性は、逆単一輻射状免疫拡散により測定される。未変性アレルゲンに対する高力価血清を兔で生成させる。特異的沈殿生成物を、シャーレ中のアガロース中に包含させたアレルゲンの種々の濃度で比較した。相対活性は、明白な沈殿を生成させる変性アレルゲンの最低濃度からそして標準として未変性アレルゲンの最低沈殿生成濃度を使用して計算された。犬アルブミン抗原性を100%活性とした。

物質番号	アレルゲン性		DAの抗原性%	免疫寛容性
	ラストDAC%	PCAの中和%		
3a	64	80	100	30
3b	21	30	50	20
3c	<3	0	<6	2
3d	77	90	50	30
3e	<10	60	25	30
3f	<5	0	<6	20
3g	<2	0	<6	2
DA	100	100	100	50

## 4. 図面の簡単な説明

第1図および第2図は本発明の手段により得られる試験結果のダイヤグラムである。

特許出願人 フアーマシア・アクチエボラーグ

代理人 弁理士 山下白

